

ENZIMAS

ALANINA AMINO TRANSFERASA (ALT) (GPT)

Objetivos

- Determinación de AST por método cinético.
- Interpretación de la información provista por el fabricante de métodos.

INTRODUCCION

Alanina aminotransferasa, ALT, L-alanina: 2-oxoglutarato aminotransferasa, glutamato piruvato transaminasa sérica, SGPT (EC 2.6.1.2)

PM: 101000 D, Clase química: enzima, proteína

Cataliza la transferencia de un grupo amino del aminoácido alanina al alfa-cetoglutarato produciendo el cetoácido piruvato y L-glutamato, a un pH óptimo de 7,2 a 7,6. La enzima humana es específica para el sustrato L-alanina y, a diferencia de la AST, el D-isómero no ejerce ningún efecto inhibitorio.

Necesita como cofactor al piridoxal-5'-fosfato derivado de la piridoxina o vitamina B6.

Se encuentra mayoritariamente en tejido hepático (actividad aproximadamente 3.000 veces mayor que en plasma) en forma de enzima citoplasmática soluble. El segundo lugar en importancia cuantitativa es el riñón siguiéndole corazón, músculo esquelético, páncreas, bazo y pulmón. Su actividad por órgano generalmente es menor a la de AST. La vida media en suero es de 47 ± 10 hs, se cataboliza en el hígado y se la encuentra en bilis probablemente como ruta menor de eliminación.

A pesar que su mayor utilidad clínica es en la enfermedad hepática, no es específica de ésta sino que se la emplea como parte de una batería de enzimas para establecer una lesión en el hígado, es decir que permite completar el perfil enzimático hepático.

ETAPA PREANALITICA

1) Condiciones del paciente:

FUENTES NO PATOLOGICAS DE VARIACION: BIOLOGICAS Y PREANALITICAS

Hay discrepancia en la bibliografía en cuanto a que el momento del muestreo no afecta las mediciones y que la variación diurna es significativa con resultados hasta un 45% más altos por la tarde que a primera hora de la mañana. El estado posprandial no afecta los resultados pero sí son alterados con los cambios de postura o estasis venosa. Por ingestión de alcohol los efectos son menores y después del ejercicio se han observado tanto aumentos como disminuciones de los niveles de ALT. Otros autores consideran que el ejercicio es el determinante más importante en hombres afectando mínimamente en mujeres y publican que el ejercicio intenso causa hasta un 50% de aumento en los valores de ALT. Un IMC elevado se asocia a un aumento de entre 40 y 50% de la media de ambas transaminasas.

El sexo y la raza no influyen demasiado en los niveles de ALT y en cuanto a la edad hasta los 15 años aproximadamente los valores de AST superan a los de ALT invirtiéndose posteriormente.

Se debe tener especial cuidado con pacientes desnutridos, más aún con aquellos que tienen hipovitaminosis B, ya que se producen valores falsamente disminuidos. La misma recomendación vale para pacientes dializados. El fallo renal produce disminución de los niveles de ALT a menudo por debajo del límite inferior de referencia para individuos sanos probablemente por la unión del P-5'-P a proteínas del suero, disminuyendo engañosamente su actividad.

Referirse a la bibliografía de Young para los efectos de las drogas en el presente método.

2) Toma de muestra:

TIPO DE MUESTRA Y CONSERVACION

El suero es la muestra de elección. Aunque los valores obtenidos por punción venosa en plasma heparinizado y en suero no varían, se recomienda no utilizar plasma heparinizado en los análisis que emplean buffer Tris. Como anticoagulantes el oxalato, citrato y EDTA pueden utilizarse sin que afecten las determinaciones. Además, la adición de yodoacetato o fluoruro a la heparina tampoco cambian los resultados. Se recomienda no guardar las muestras en contacto con el paquete globular durante mucho tiempo y evitar la hemólisis ya que los eritrocitos contienen 3 a 5 veces más ALT que el suero. Si la hemólisis es intensa se producen valores falsamente aumentados por lo que deben desecharse.

Las muestras con concentraciones de cetoácidos endógenos particularmente elevadas producen valores falsamente aumentados.

La ALT es estable 3 días en el suero a temperatura ambiente y hasta una semana a 4°C aunque pierde hasta un 20% de actividad enzimática. Es inestable si se la congela a - 25°C.

ETAPA ANALITICA

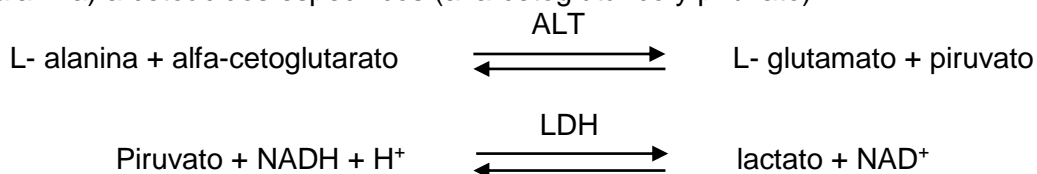
1) Metodología: GPT (ALT) UV unitest – WIENER Lab.

Método cinético UV recomendado por la IFCC, la SSCC y la DGKC

FUNDAMENTO

La reacción básica no forma productos que puedan medirse directamente por lo que se desarrolla el método acoplando una segunda reacción catalizada por una enzima denominada indicadora.

La ALT cataliza la transferencia de un grupo amino de aminoácidos específicos (L- glutámico o L- alanina) a cetoácidos específicos (alfa-cetoglutarato y piruvato):



En este caso la reacción principal está desplazada hacia la formación de piruvato, que reacciona inmediatamente con la LDH, de modo que la velocidad de oxidación del NADH es proporcional a la actividad de ALT en la muestra. El exceso de LDH permite consumir cetoácidos endógenos, evitando así su interferencia.

Las concentraciones del ensayo están optimizadas de acuerdo con la IFCC y la SSCC

REACTIVOS

Buffer: solución de Buffer Tris pH 7,5 (a 30°C) con L- alanina. Listo para usar.

Sustrato: viales conteniendo 2- oxoglutarato, nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) y lactato deshidrogenasa (LDH). Para usar, agregar 2 ml de Buffer a un vial de sustrato. Tapar, agitar hasta disolución completa y fechar.

Los reactivos provistos son estables en refrigerador (2-10°C) hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja.

El sustrato reconstituido es estable 5 días en refrigerador (2-10°C) o 1 día a temperatura ambiente a partir del momento de su reconstitución (ver inserto del fabricante).

CONDICIONES DE REACCION (Disminución de absorbancia)

- Longitud de onda: 340 nm.
- Temperatura de reacción: 25, 30 ó 37°C. Ver los VALORES DE REFERENCIA correspondientes a cada temperatura.
- Tiempo de reacción: 4 minutos.
- Volumen de muestra (200 ul) y de sustrato reconstituido (2 ml). Si el volumen de lectura del espectrofotómetro lo permite, se pueden reducir proporcionalmente sin que varíe el factor de cálculo.
- Cuando el espectrofotómetro ha sido llevado a cero con agua destilada y se observan lecturas de absorbancia del sustrato reconstituido inferiores a 0,800 D.O. o superiores a 1,800 D.O. (a 340nm), no utilizarlo.

PROCEDIMIENTO

Reconstituir el Reactivo liofilizado. Preincubar a 37°C 2 ml por 5 min. Agregar 200 ul de muestra, mezclar por agitación y verter en la cubeta. Disparar el cronómetro. Esperar 1min y leer la absorbancia inicial y luego a los 1, 2 y 3 min. Determinar las diferencias promedio de absorbancia/min ($\Delta A/\text{min}$) restando cada lectura de la anterior y promediando los valores. Utilizar el ΔA promedio para los cálculos.

ACTIVIDAD de GPT (U/l) = $\Delta A/\text{min}$. x factor

Factor = (vol. reacción / vol. muestra) x 1 / coef. extinción NADH

Coeficiente de extinción del NADH a 340 nm = $6,22 \times 10^3$ l/cm-mol

En cada caso deberá emplearse el factor de cálculo correspondiente de acuerdo a la temperatura de reacción seleccionada (30-37°C o 25°C), como se indica en la siguiente tabla:

Temperatura Long.de onda	30-37°C	25°C
340 nm	1.740	791
334 nm	1.780	809
366 nm	3.207	1.453

LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

- Absorbancia inicial baja: cuando una vez agregado el suero la primera lectura (tiempo 0) es inferior a 0,800 D.O., estando el Sustrato en condiciones, indica una muestra con muy alta actividad de GPT (que consume el NADH aún antes de esta lectura) o con una concentración de cetoácidos endógenos particularmente elevada. En este caso, repetir la determinación con muestra diluida con solución fisiológica y multiplicar el resultado por la dilución efectuada.
- La humectación es causa de deterioro del Sustrato.

RENDIMIENTO ANALITICO DEL METODO

REPRODUCIBILIDAD: A un nivel de 19,8 U/l procesando replicados se obtiene un C.V. de 5,63 % y para 118 U/l un C.V. de 1,71%.

RANGO DINÁMICO: el rango útil de lectura se extiende hasta 0,200 $\Delta A/\text{min}$ (a 340 nm). Si la $\Delta A/\text{min}$ es superior a 0,200 (a 340-334 nm) o 0,100 (a 366 nm) se debe repetir la determinación con muestra diluida (1:5 ó 1:10) con solución fisiológica, corrigiendo los resultados.

SENSIBILIDAD: a 340 nm y a 30 ó 37°C el mínimo cambio de actividad detectable es de 1,8 U/l.

VALORES DE REFERENCIA (U/l)

Temperatura	25°C*	30°C*	37°C
Hombres	hasta 22 U/l	hasta 29 U/l	hasta 41 U/l
Mujeres	hasta 17 U/l	hasta 22 U/l	hasta 31 U/l

* Calculados

Se recomienda que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia, fundamentalmente por las diferentes concentraciones y el origen de la enzima indicadora (LDH) en los equipos comerciales.

En recién nacidos normales se ha informado un intervalo de referencia de hasta el doble del nivel superior del adulto declinando hasta nivelar los valores aproximadamente a los 3 meses de edad. Esto se ha atribuido a la fuga enzimática desde los hepatocitos que, por inmaduros, poseen membranas más permeables.

ETAPA POSTANALITICA

Interpretación y validación del resultado:

La causa más común de los niveles aumentados de ALT es la enfermedad hepática. Cuando existe deficiencia en la síntesis de piridoxina, la síntesis hepática de ALT está afectada; un fenómeno similar se produce en la fibrosis hepática y en la cirrosis.

Aumentos de los niveles de transaminasas de más de 8 veces por encima de los límites de referencia con un aumento mínimo o inexistente de los niveles de fosfatasa alcalina caracterizan el daño hepatocelular agudo. En la mayoría de sus formas (viral, inducido por drogas, tóxico o isquémico), al principio el nivel de AST será mayor que el de ALT, debido a la elevada actividad de la primera en los hepatocitos. Al cabo de entre 24 y 48 hs., sobre todo si persiste el daño, la ALT alcanza niveles mayores que la AST, ya que su vida media es más larga.

Con daño hepático alcohólico, los niveles de transaminasas aumentan mínimamente y cuando existe daño hepático masivo los niveles pueden ser inicialmente altos, pero muestran un patrón consistente de descenso.

Los niveles plasmáticos de enzimas no guardan relación con la gravedad del daño hepatocelular.

La hepatitis crónica normalmente se identifica por los niveles elevados de enzimas citoplasmáticas, en especial ALT. En la mayoría de los casos, los niveles de ALT son de una a cuatro veces superiores a los límites de referencia, siendo menor el aumento de los niveles de AST. En la progresión hacia cirrosis los niveles de ALT disminuyen progresivamente mientras que los de AST permanecen aproximadamente iguales causando un aumento en la relación.

Los niveles engañosamente bajos de transaminasas, particularmente los de ALT, en el fallo renal originan problemas en el reconocimiento del daño hepático en los individuos afectados.

Comparar esta guía con la guía del inserto provisto por Wiener del método a usar en el trabajo práctico y anotar las coincidencias o diferencias.

Buscar Valores de Referencia y citar la bibliografía.

BIBLIOGRAFIA

Gradwohl- Sonnerwirth- Jaret "Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico" 8ª edición 1983. Capítulos 9 y 12. Editorial Panamericana.

Todd - Sanford "Diagnóstico clínico por el laboratorio" I. Davidson y J. B. Henry. 8ª edición (1988). Editorial Salvat.

Kaplan, L. - Pesce, A. "Química Clínica. Técnicas de laboratorio. Fisiopatología. Métodos de Análisis". Edición en inglés 1984. Editorial Panamericana.

Pesce, A. - Kaplan, L. "Química Clínica. Métodos" Edición 1990 (en inglés 1987). Editorial Panamericana.

Balcells, Alfonso "La Clínica y el Laboratorio" 16ª edición. Editorial Masson S.A. Barcelona (España). Clinical Chemistry. 1995. Chapter 20: Enzymes.

Luis Morán Villatoro "Obtención de muestras sanguíneas de calidad analítica" mejoría continua de la etapa preanalítica. 2001. Editorial Panamericana.

Henry, John Bernard M.D. "El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico" 20ª edición homenaje a Todd – Sanford y Davidsohn (2001). Ed. Marbán Libros (España) 2005.

Agregar bibliografía utilizada para estudiar el tema.